

**ANTICANCER DRUG**

Patent Number: JP4235919

Publication date: 1992-08-25

Inventor(s): OTSUKA EIKO; others: 01

Applicant(s): SANKYO CO LTD

Requested Patent:  JP4235919

Application Number: JP19910003528 19910117

Priority Number(s):

IPC Classification: A61K31/70

EC Classification:

Equivalents:

---

**Abstract**

---

PURPOSE: To provide the subject anticancer drug containing, as the active component, a ribozyme having a specific breaking activity to mRNA transcribed by oncogene.

CONSTITUTION: A hammer head type ribozyme having a nucleotide sequence of formula I or II (A is adenine nucleotide; U is uracil nucleotide; C is cytosine nucleotide; G is guanine nucleotide; 3' and 5' show 3' and 5' terminal respectively) is contained as the active component. The above-mentioned ribozyme can break only activated ras-gene mRNA molecule and can not break normal m-RNA molecule.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

---

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-235919

(43)公開日 平成4年(1992)8月25日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
A 61 K 31/70  
// C 07 H 21/02  
C 12 N 15/11

識別記号 庁内整理番号  
ADU 8317-4C  
ZNA 7822-4C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数2(全7頁)

(21)出願番号

特願平3-3528

(22)出願日

平成3年(1991)1月17日

(71)出願人 000001856

三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

(72)発明者 大塚 栄子

札幌市中央区南10条西18-1-3-614

(72)発明者 小泉 誠

札幌市豊平区北野7条4-5-1

(74)代理人 弁理士 大野 彰夫 (外2名)

(54)【発明の名称】 制癌剤

(57)【要約】 (修正有)

抗腫瘍効果を示す。

【目的】ハンマー・ヘッド型リボザイムの触媒活性が1塩基の違いを認識することを利用して、活性型c-Ha-ras mRNAを基質として特異的に切断するリボザイムを構築し、かかるリボザイム分子を有効成分とする抗腫瘍剤の開発を目指した。

【構成】式[I]のヌクレオチド配列を有する化合物または、式[I]の3'末端にCA<sup>3'</sup>、および5'末端にCGU<sup>5'</sup>、の5ヌクレオチドが付いたヌクレオチド配列を有する化合物を有効成分とする抗腫瘍剤。



「式中、Aはアデニンヌクレオチド、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表わし、3'および5'はそれぞれ3'末端および5'末端を表わす。」

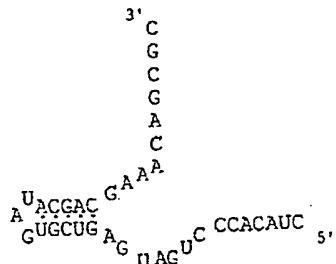
【効果】本発明の、癌遺伝子より転写されるmRNAに対して特異的な切断活性を有するリボザイムは、有効な

1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】一般式

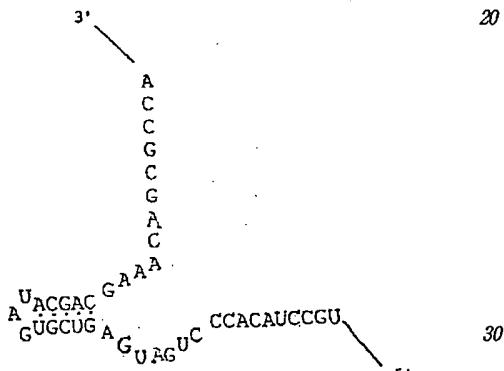
## 【化1】



「式中、Aはアデニヌクレオチド、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Gはグアニヌクレオチドを表わし、3'および5'はそれぞれ3'末端および5'末端を表わす。」で表わされる化合物を有効成分とする抗腫瘍剤。

## 【請求項2】一般式

## 【化2】



「式中、Aはアデニヌクレオチド、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Gはグアニヌクレオチドを表わし、3'および5'はそれぞれ3'末端および5'末端を表わす。」で表わされる化合物を有効成分とする抗腫瘍剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、癌遺伝子より転写されるmRNAに対して特異的な切断活性を有するリボザイムを有効成分とする抗腫瘍剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】RNAは、遺伝情報伝達物質としての役割を担っているばかりでなく、それ自身が触媒的に作用してRNAの切断や連結を行なう機能を有する（以下、このような機能を有するRNAを「リボザイム」という。）ことが知られている。そして、リボザイムは、切断部位近傍の塩基配列や反応の性質からさらに、①ハンマーヘッド型RNA、②ヘアピン型RNA、③クローバーリーフ状RNA、④その他の自己切断反応RNAの4

50

種類に分類できる（蛋白質 核酸 酶素、vol.35、No.1  
3、2191-2200、(1990)）。

【0003】本発明者らは、ハンマーヘッド型リボザイムが、標的RNAを配列特異的に切断するエンドヌクレアーゼとして利用できることを見出し、この内容についてはすでに報告しており、以下に詳細を記載する（Nucleic Acid Res., vol.17, 7059-7071, (1989)）。c-Ha-ras遺伝子は、分子量21,000の蛋白質(p21)をコードしている。ヒトの癌から検出された活性化ras遺伝子は、塩基の点突然変異によりp21のアミノ酸にいくつかの変異が生じている。リボザイムがこのうちの1塩基の違いを認識できるか否かを調べた。リボザイムは、p21の12番目のGly(GGU)がVal(GUU)に変異した活性化ras遺伝子mRNAを切断し、正常mRNAは切断しないように設計した。そして、試験管内の実験においては、このリボザイムが、活性化ras遺伝子mRNA分子のみを切断し、正常mRNA分子は切断しないことを確認したのである。

## 【0004】

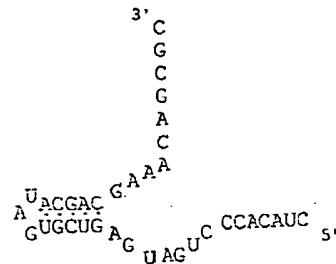
20 【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、リボザイムの有する触媒活性が1塩基の差異をも認識する機能を利用して、腫瘍遺伝子より転写されるmRNAを特異的に切断するリボザイムが有効な抗腫瘍効果を示すことを見出し、本発明を完成した。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、一般式

## 【0006】

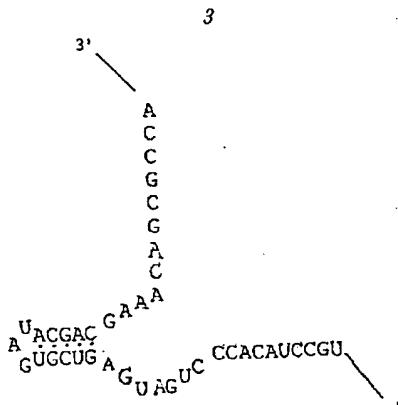
## 【化3】



## 【0007】または

## 【0008】

## 【化4】



【0009】「式中、Aはアデニヌクレオチド、Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Gはグアニヌクレオチドを表わし、3'および5'はそれぞれ3'末端および5'末端を表わす。」で表わされる化合物を有効成分とする抗腫瘍剤に関する。

【0010】本発明において、「腫瘍」とは、活性化した癌遺伝子によってもたらされる疾患を意味するが、とくに好適には、活性化c-Ha-ras遺伝子によってもたらされる疾患を意味するものとする。

【0011】本発明の化合物(I)および(II)は、公知の方法(Nucleic Acid Res., vol.17, 7059-7071)で製造することができる。

【0012】本発明において、リボザイムの抗腫瘍効果の確認は、以下の方法により行なうことができる。

【0013】すなわち、NIH-3T3細胞を、目的とするリボザイムを発現するプラスミドにより形質転換した細胞を調製し、さらにこの細胞に活性化c-Ha-ras遺伝子を形質導入して、リボザイムを発現しないプラスミドにより形質転換した細胞とのフォーカス形成率を比較する方法である。

【0014】本発明により得られるリボザイムは、様々な態様で投与することにより極めて有効な抗腫瘍効果を示す。

【0015】本発明のリボザイムを投与するための方法は、経口投与または非経口投与(例えば、静注、筋注、皮下注または腹腔内注)であり、投与される組成物には、治療上有効量の生成物が、薬理上許容される希釈剤、担体および/又はアジュバントとともに通常含有される。

【0016】ヒト血清アルブミンのような標準的希釈剤が本発明の医薬的組成物として考えられ、生理的食塩水のような標準的担体が同様に考えられうる。

【0017】投与形態としては、皮下注射、静脈内注射、筋肉注射、座剤などの非経口投与法、または、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤などによる経口投与法が挙げられる。

【0018】なお、リボザイム分子をリポソームに封入して、経口または非経口により投与することも可能であ

る。

【0019】投与量は、投与経路または投与回数などによって異なるが、例えば、成人に対しては、通常は、一日1~1,000 μg/kg体重を一日に1回または数回に分けて投与するのが好ましい。

【0020】以下、参考例、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

【0021】なお、以下の、参考例、実施例においては、アデニヌクレオチドをA、グアニヌクレオチドをG、シトシンヌクレオチドをC、ウラシルヌクレオチドをUと記載する。

【0022】[参考例] オリゴデオキシリボヌクレオチドは、アプライドバイオシステムズ社製380A-D DNAシンセサイザーを用いホスホロアミダイト法で合成した。オリゴリボヌクレオチドは、5'水酸基の保護基にジメトキシリチル基、2'水酸基の保護基にテトラヒドロピラニル基を用いたホスホロアミダイト法(Nucleic Acid Res., vol.17 7059-7071, (1989))で合成した。

【0023】pRSV-rv12, pRSV-r161の構築は、文献(Cancer Res., vol. 80, 200-203, (1989))に記載された方法に従った。

【0024】参考例1 リボザイムCUACACCCUGAUGAAGGG  
UGAUACCCUGAACAGCGCpの調製  
オリゴリボヌクレオチド(UACCCUGAACAGCGCG, 5 nmol)  
にボリヌクレオチドキナーゼ(10単位、寶酒造(株)製)、0.67 mM ATP、50 mM Tris-HCl(pH 7.6)、  
10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM メルカプトエタノールを加え、37  
℃で1時間加温した。フェノールクロロホルムにより  
処理し、セファデックスG-25(ファルマシア社製:φ1.  
8 x 37 cm、溶媒は0.1 M トリエチルアンモニウムバ  
イカーボネート(以下「TEAB」という。)で脱塩して、  
ATP、ADPを除いた。

【0025】得られた5'-リン酸化オリゴリボヌクレオチド(pUACCCUGAACAGCGCG)を滅菌水(20 μl)に溶解し、0.1 M NaIO<sub>4</sub>(2.5 μl)を加え、暗所で0 ℃、70分放置し、0.1 M エチレンギリコール(25 μl)を加え、0 ℃、30分反応させた。これに2 M リジン-HCl(pH 8.2, 50 μl)を加え、45℃、2時間加温し、セファデックスG-25(φ1.8 x 37 cm、溶媒は0.1 M TEAB)で脱塩した。これを陰イオン交換HPLC(TSK gel DE AE-2SW, φ0.46 x 25 cm:東ソー(株)製)で精製することによって5',3'-ジリン酸を有するオリゴリボヌクレオチド(pUACCCUGAACAGCGCp)を得た。

【0026】別途調整したオリゴリボヌクレオチド(CU ACACCCUGAUGAAGGGUGA, 2.5 nmol)および上記のオリゴリボヌクレオチド(pUACCCUGAACAGCGCp, 2.5 nmol)を50 mM HEPES-NaOH(pH 7.5), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 3.3 mM DT  
T, 0.001% BSA, 10%(v/v)DMSO, 1.38 単位/μl RNA

リガーゼ(寶酒造(株)製)、100 μM ATPの溶液50 μl中、6°Cで13.5時間加温した。フェノールクロロホルム処理をし、陰イオン交換HPLCで目的の鎖長のリボザイムCUACACCCUGAUGAAGGGUGAUACCCUGAACAGCGCpを得た。

**[0027] 参考例2 活性化c-Ha-ras DNAテンプレートの調製**

12番目のアミノ酸をコードするコドンに点突然変異を起こした(Gly12(GGU)→Val12(GUU))活性化c-Ha-rasDNAを調製した。

**[0028]** 7本の合成オリゴデオキシリボヌクレオチド(1 nmol)をそれぞれT4ポリヌクレオチドキナーゼ(1 μl, 10単位)、1 mM ATP(15 μl)、緩衝液(4 μl, 250 mM Tris-HCl(pH 7.6), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM メルカプトエタノール)を加え、37°Cで1時間加温した。

**[0029]** これらを合わせ、緩衝液(40 μl, 330 mM Tris-HCl(pH 7.6), 33 mM MgCl<sub>2</sub>)、2.5 mM ATP(48 μl)を加えて75°Cで5分間加熱し室温まで徐冷した。0.2 M 2-メルカプトエタノール(10 μl)、T4 DNAリガーゼ(2 μl, 700単位、寶酒造(株)製)を加え、15°Cで15時間反応させた。エタノール沈殿後、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分取し、約3 μgの活性化c-Ha-rasDNAテンプレートを得た(図1)。

**[0030]** なお、正常c-Ha-ras mRNAも同様の方法で調製した。

**[0031] 参考例3 T7 ポリメラーゼによる活性化c-Ha-ras mRNAの調製**

転写反応は、公知の方法(実験医学、第8巻、(13)、1685-1689頁、(1990))により、次の条件で行なった。得られた活性化c-Ha-rasDNAテンプレート(30 pmol)、緩衝液(40 mM Tris-HCl(pH 8.1), 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 1 mM スペルミジン, 0.01%(v/v) Triton X-100, 0.05 μg/μl 牛血清アルブミン、4 mM 4NTPs(ATP, GTP, CTP, およびUTP; 以下「4NTPs」という。)、8%(W/V) ポリエチレングリコール)に溶解し、T7 RNAポリメラーゼ(840単位、ファルマシア社製)を加え、37°Cで2時間加温することにより転写反応を行なった(図1)。フェノールクロロホルム処理をして、セファデックスG-50(Φ1.8 × 37cm, 溶媒は0.1 M TEAB)で脱塩し、未反応の4NTPsを除いた後、8 M 尿素を含む10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。

**[0032]** なお、正常c-Ha-ras mRNAも同様の方法で調製した。

**[0033] 参考例4 活性化c-Ha-ras mRNAの5'末端標識**

活性化c-Ha-rasRNA(20 pmol)を0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)に溶解し、大腸菌由来アルカリ性fosファターゼ(0.02単位、寶酒造(株)製)を加え、37°C1時間加温した後、フェノールクロロホルム処理を2回行ない、[γ-<sup>32</sup>P]ATP(5 μCi)、50 mM Tris-HCl(pH 7.

6)、10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM 2-メルカプトエタノール、T4ポリヌクレオチド・キナーゼ(1単位、寶酒造(株)製で5'末端をリン酸化し、NENSORB 20(デュポン社製)脱塩、除蛋白を行なった。

**[0034]** なお、正常c-Ha-ras mRNAも同様の方法で標識した。

**[0035] 参考例5 in vitroでの切断反応**

参考例4で得られた活性化c-Ha-ras mRNA(5 pmol)に、参考例1で得られたリボザイム(7.5 pmol)を加え、40 mM Tris-HCl(pH 7.5)、20 mM NaCl、25 mM MgCl<sub>2</sub>になる溶液を加え、37°Cで加温し、50 mM EDTAを加え反応を停止した。55°C、33分急冷したものと8 M 尿素を含む10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。切断率はゲルを切り出し、液体シンチレーションカウンターで測定することにより求めた。

**[0036]** 対照として、正常c-Ha-ras mRNAについても同様の実験を行なった。

**[0037]** この結果、参考例1で得られたリボザイムは、正常c-Ha-ras mRNAは切断せず、活性化c-Ha-ras mRNAのみを切断することが確認された。

**[0038]**

**[実施例] 実施例1 プラスミドpKCSの構築**

pRSVneo(5 μl, 1.4 pmol)をHind III(12単位)で37°C、一夜加温して消化し、エタノール沈殿により消化物を得た。これに滅菌水(10 μl)、緩衝液(4 μl, 330 mM Tris-HCl(pH 7.6), 33 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM ATP)、0.2 M 2-メルカプトエタノール(1 μl)、40 μg Cia I-Sal I リンカー(5 μl, 7 pmol:図2)、T4リガーゼ(10単位)を加え、16°C、2時間加温した。エタノール沈殿後、pKCSを得た。これを大腸菌HB101にトランسفクトし、文献公知の方法(Anal. Biocem., vol. 113 34-42, (1989))に従い、250 ml の培地から約450 μgのpKCSを単離した(図3)。

**[0039] 実施例2 プラスミドpRZ1の調製**

pKCS(7.5 μl, 2.5 pmol)をCia I(15単位)で37°Cで2時間加温し消化後、Sal I(30単位)で37°Cで一夜加温して消化した。0.1 M Tris-HCl(pH 8.0, 48 μl)に溶解し、大腸菌由来アルカリ性fosファターゼ(0.7単位)を加え、37°Cで2時間加温した。フェノールクロロフォルム処理後、エタノール沈殿により消化物を得た。別途調製した、リボザイム(CUACACCCUGAUGAAGGGUGAUACCCUGAACAGCGCp)遺伝子を含む2本鎖オリゴリボヌクレオチドも同様にCia I、Sal Iで消化した(図4)。このpKCS Cia I-Sal I消化物に上記のリボザイム遺伝子を加え、T4 DNAリガーゼで連結し、pRZ1を得た。これを大腸菌HB101にトランسفクトし、文献公知の方法(Anal. Biocem., vol. 113 34-42, (1989))に従い、250 ml の培地から約470 μgのpRZ1を単離した(図3)。

**[0040] 実施例3 プラスミドpRZ2の調製**

7

上記と同様の方法により、リボザイム (UGCCUACACCCUGA UGAGUCGUGAUACGACGAAACAGCGCCAp) 遺伝子を組み込んだプラスミドpRZ2を調製した。

【0041】実施例4 プラスミドpRZ3の調製

上記と同様の方法により、リボザイム (CUACACCCUGAUGA GGGGCCUUUUCGGAAACAGCGCp) を組み込んだプラスミドpRZ3を調製した。

【0042】実施例5 pRZ1、pRZ2またはpRZ3でトランスフォームさせたNIH3T3細胞の調製

pRZ1 (1 μg)、NIH3T3細胞DNA (30 μg) に2 M CaCl<sub>2</sub> (62.5 μl) を加え、滅菌水で全量 500 μl とした。これをHBS 溶液(11.92 g HEPES, 16.36 g NaCl, 0.23 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.1) /1000 ml) 500 μl 中に滴下し、30分放置し、リン酸カルシウム沈殿を形成させた。 NIH3T3細胞を (8 × 10<sup>5</sup> 細胞) 培養したシャーレにこれを加え、37°Cで5 時間培養した（リン酸カルシウム法）。そして、10% ウシ血清を含むDMEM培地（ダルベッコ変法イーグル最少培地）を除き、17% グリセリン (2 ml) を加え1 分45秒放置後、DMEM培地 (10 ml) を加えた。DMEM培地 (10% ウシ血清を含む。) に交換し、37°Cで15時間培養した。トリプシン処理をし、細胞をシャーレよりはがし3枚のシャーレに広げ、DMEM培地 (5% ウシ血清を含む。) で培養した。4日後、GENETICIN (300 mg/500 ml, ギブコ社製) を加えたDMEM培地 (5% ウシ血清を含む。) に交換して7日間培養し、pRZ1/NIH3T3 細胞を得た。

【0043】pKCS、pRZ2、pRZ3でトランスフォームさせたpKCS/NIH3T3 細胞、pRZ2/NIH3T3細胞、pRZ3/NIH3T3 細胞も同様にして得た。

【0044】実施例6 活性化c-Ha-ras遺伝子 (pRSV-rv12) によるトランスフォーメーション

pRSV-rv12 (20 ng)、NIH3T3細胞DNA (30 μg) を用いて上記と同様のリン酸カルシウム法で、pKCS/NIH3T3 細胞、pRZ2/NIH3T3 細胞、pRZ3/NIH3T3 細胞をトランスフォームした。その後、DMEM培地 (5% ウシ血清を含む。) で約2週間培養した。

【0045】なお、pRSV-rv12 は、正常c-Ha-rasの12番目のアミノ酸をコードするコドンに点突然変異を起こした (Gly 12(GGU) →Val 12(GUU) ) 活性化c-Ha-rasDNAを組み込んだものである。

【0046】対照として、正常c-Ha-rasの12番目のアミノ酸をコードするコドンに変化がないが、61番目のアミノ酸をコードするコドンに点突然変異を起こした

10

(Gln61→Leu 61) 活性化c-Ha-ras DNAを組み込んだpRSV-rv161 を用いて、上記の各細胞をトランスフォームし、培養をした。

【0047】培養後、細胞をギムザ染色し、生じたフォーカスの数を数えた。

【0048】結果を図5に示す。

【0049】(A) のグラフがpRSV-rv12 によりpKCS/NIH3T3 細胞、pRZ1/NIH3T3 細胞、pRZ2/NIH3T3 細胞、pRZ3/NIH3T3 細胞をそれぞれトランスフェクトしたときのフォーカスの数である。

【0050】(B) のグラフがpRSV-rv161 によりpKCS/NIH3T3 細胞、pRZ1/NIH3T3 細胞、pRZ2/NIH3T3 細胞、pRZ3/NIH3T3 細胞をそれぞれトランスフェクトしたときのフォーカスの数である。

【0051】pRZ1/NIH3T3 細胞、pRZ2/NIH3T3 細胞、においては、pRSV-rv12 によるトランスフェクションにおいて、約50% のフォーカス形成阻害が見られたが、pRZ3/NIH3T3 細胞では阻害が見られなかった。

20

【0052】pRSV-rv161 でトランスフェクトした場合、pKCS/NIH3T3 細胞と比較して、フォーカス形成阻害を示さなかつたところから、該プラスミドにより転写される活性化c-Ha-ras mRNAには、リボザイムが何の効果も示さないことが確認された。したがって、本発明のリボザイムは、正常c-Ha-rasの12番目のアミノ酸をコードするコドンに点突然変異を起こした (Gly 12(GGU) →Val 12(GUU) ) 活性化c-Ha-ras mRNAを特異的に切断することが結論付けられた。

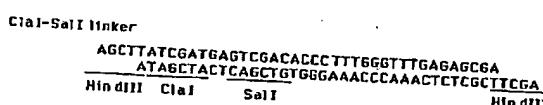
【0053】

【発明の効果】本発明の、癌遺伝子より転写されるmRNAに対して特異的な切断活性を有するリボザイムは、有効な抗腫瘍効果を示すものであり、このものを有効成分とする抗腫瘍剤としての使用を期待しうるものである。

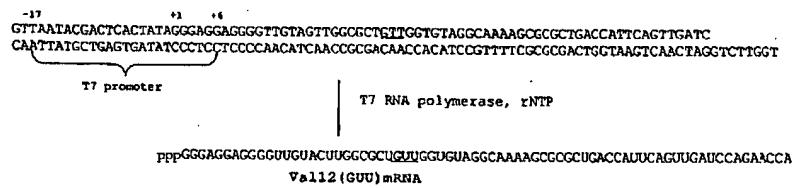
【図面の簡単な説明】

図1は、活性化c-Ha-rasDNAテンプレートおよびそれより転写された活性化c-Ha-ras mRNAを示し、図2は、Cla I-Sal I リンカーのスクレオチド配列を示し、図3は、プラスミドpRZ1の構築方法を示し、図4は、リボザイム遺伝子を含むオリゴリボヌクレオチドを示し、図5は、リボザイム遺伝子を運搬するプラスミドによりトランスフェクトされた細胞における癌遺伝子によるフォーカス形成の阻害率を示す。

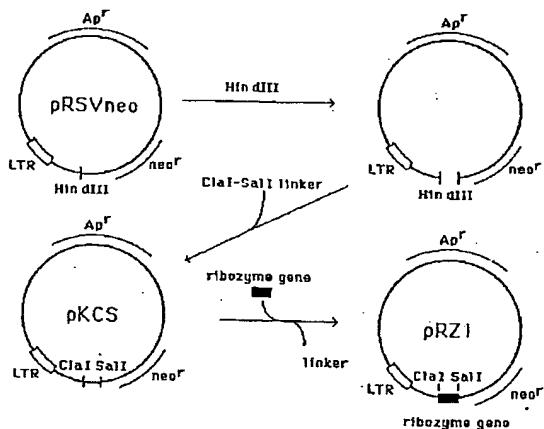
【図2】



[図1]



[图3]



[図4]

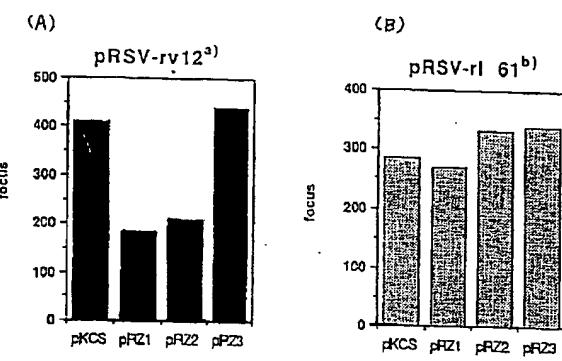
The diagram illustrates the structure of a ribozyme gene. It shows a double-stranded DNA sequence with various restriction enzyme cleavage sites indicated by vertical arrows pointing downwards. The enzymes shown are **Cla**I, **Sma**I, and **Sal**I. The **Cla**I site is located in the upper strand between positions 10 and 11. The **Sma**I site is located in the lower strand between positions 10 and 11. The **Sal**I site is located in the upper strand between positions 12 and 13. The DNA sequence is as follows:

```

    GGGATCGATCTACACCCCTGATGAGTCGTGATAACGACGAAACAGCAGTCGACGCGG
    CCCTAGCTAGATGTTGGGACTACTCAGCACTATGTCGCTT GTCGCGTAGCTGCCC
  
```

Below the sequence, the cleavage products are labeled: **Cla**I, **Sma**I digestion, and **Sal**I.

[図5]



a) pRSV-rv12 (Val-12, Gln-61)  
 b) pRSV-rl 61 (Gly-12, Leu-61)